

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年3月11日 (11.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/020671 A1

(51) 国際特許分類: C12Q 1/68, C12N 15/31

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010846

(22) 国際出願日: 2003年8月27日 (27.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-255126 2002年8月30日 (30.08.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ニチレイ (NICHIREI CORPORATION) [JP/JP]; 〒104-8402 東京都中央区築地六丁目19番20号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小泉 雄史 (KOIZUMI, Takeshi) [JP/JP]; 〒261-8545 千葉県千葉市美浜区新港9番地 株式会社ニチレイ 研究開発部内 Chiba (JP). 西山 葉子 (NISHIYAMA, Yoko) [JP/JP]; 〒261-8545 千葉県千葉市美浜区新港9番地 株式会社ニチレイ 研究開発部内 Chiba (JP). 山本 敏 (YAMAMOTO, Satoshi) [JP/JP]; 〒261-8545 千葉県千葉市美浜区新港9番地 株式会社ニチレイ 研究開発部内 Chiba (JP). 福山 正文 (FUKUYAMA, Masafumi) [JP/JP]; 〒229-8501 神奈川県相模原市 瀬野辺1-17-71 麻布大学 環境保健学部内 Kanagawa (JP). 古畑 勝則 (FURUHATA, Katsunori) [JP/JP]; 〒229-8501 神奈川県

県相模原市 瀬野辺1-17-71 麻布大学 環境保健学部内 Kanagawa (JP). 大仲 賢二 (OONAKA, Kenji) [JP/JP]; 〒229-8501 神奈川県相模原市 瀬野辺1-17-71 麻布大学 環境保健学部内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PRIMER AND PROBE FOR DETECTING *VIBRIO VULNIFICUS* AND DETECTION METHOD USING THE SAME

(54) 発明の名称: ビブリオ ブルニフィカスの検出用プライマー及びプローブ並びにそれらを用いる検出方法

(57) Abstract: It is intended to construct a specific gene amplification primer to be used for detecting, quantifying and identifying *Vibrio vulnificus* which is practically satisfactory in amplification efficiency and amplification specificity with little risk of miss judgment. Partial base sequences of gyrB gene, rpoD gene and recA gene of *Vibrio vulnificus* and its analog are determined and the systemic relation among them is clarified. Thus, bases characteristic to *Vibrio vulnificus* are identified so as to enable the design of a highly specific probe containing the same and a gene amplification primer having a high specificity and an excellent amplification efficiency.

(57) 要約: 誤判定の可能性が低く、かつ実用上十分な増幅効率と増幅特異性を有する、高性能なビブリオブルニフィカス検出・定量・同定用特異遺伝子増幅プライマーを作製すること。本発明者等は、ビブリオブルニフィカス及びその近縁種のgyrB遺伝子、rpoD遺伝子、及びrecA遺伝子の部分塩基配列を決め、その系統関係を明らかにし、ビブリオブルニフィカスに特徴的塩基を同定し、これを含む高特異性を有するプローブ、及び高特異性を有しかつ増幅効率に優れた遺伝子増幅用プライマーを設計することを可能とした。

明 細 書

ビブリオ ブルニフィカスの検出用プライマー及びプローブ並びにそれらを用いる検出方法

技術分野

本発明は、食品検査、疫学的環境検査、並びに臨床検査における、ビブリオ ブルニフィカス (*Vibrio vulnificus*) の検出・同定・計数方法に関するものである。

背景技術

ビブリオ ブルニフィカスは、海水や汽水域に生息する好塩性グラム陰性細菌である。健康人への感染は稀であるが、肝硬変などの重度の基礎疾患を持つ患者には感染して重篤な感染症を起こすことがあり、死亡例を伴う感染菌として公衆衛生の立場から注目されている。本菌による感染症は 1970 年に Roland により下肢壊疽から分離された (*New Engl. J. Med.*, 282, 1306、1970) のが最初の報告例であるが、当初は腸炎ビブリオの腸管外感染例とされていた。その後、この菌が大腸菌などと比較して反応が遅いが乳糖分解能をもつこと、8%食塩の存在下では増殖できないことなどが明らかになり、1979 年 Farmer によりビブリオブルニフィカスと命名された (*Lancet*, ii, 903、1979)。

本菌は生物学的性状から生物型 1～3 型に分類されている (*Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 1460-1466 1997、*Lancet*, 354, 1421-1424 2000)。ヒトの感染症から分離されるのは主として 1 型であり、2 型は主に魚の病原菌として分離される。また、3 型は 1996 年～1997 年に起きたイスラエルでの集団感染の病原菌として分離された (*Lancet*, 354, 1421-1424 2000)。

本菌による感染様式には経口感染型と創傷感染型がある。経口感染は主として夏場に生の魚介類を喫食することにより感染し、24 時間以内に発熱、腹痛、下痢、嘔吐などの消化器病の症状を経た後に敗血症を併発し、平均 48 時間で死に至る。死亡率は 50～70%と非常に高い。また、創傷感染は創傷への海水の接触により感染し、12 時間の潜伏期間を経て 1 週間以内に発症する。致死率は経口感染よりは低く 25%である。米国では 1988 年～1996 年までに 22 州で 422 事例の報告があり、その感染源は、米国の食習慣から生牡蠣摂取による場

合が多数を占めている。一方、我が国でも関東以西の太平洋側で約 90 事例の報告があり、刺身、鮓など生の魚介類の喫食が感染の主な原因となっている。最近では、2001 年 7 月に熊本で、生のシャコ、コチの喫食により 4 名が感染し、うち 2 名が死亡するなど、魚介類の生食文化を有するわが国では、ビブリオブルニフィカス感染症は警戒すべき感染症であるといえる。

本菌の選択的分離には、主として腸炎ビブリオ同様 TCBS 寒天培地が用いられてきた。ビブリオブルニフィカスは、TCBS 培地上で腸炎ビブリオとよく似た緑青色のコロニーを形成し、その判別のためには種々の生化学的性状の確認を行う必要があり、煩雑である上誤判定の危険を伴っている。一方で、SPS agar (SDS-polymixin B sucrose agar) 培地 (*FEMS Microbiol. Lett.*, 17, 205-209 1983) や cellobiose-collistin agar 培地 (*Appl. Environment. Microbiol.*, 64, 1721-1724 1998) などの改良選択分離培地も報告されているが、生化学的性状の確認作業を行うことに変わりはない。

一方、これまでに、他の食中毒菌と同様に、遺伝子工学的手法を応用したビブリオブルニフィカスの検出法が幾つか開発されている。*wza* は、莢膜多糖 CPS (capsular polysaccharide) をペリプラスムから外膜へ移動させるのに必要なトランスポーターをコードする遺伝子として *E. coli* で見出された遺伝子である。ビブリオブルニフィカスでは莢膜の無い株がマウスに対する毒性を示さないこと、および、*wza* 欠損株がマウスに対する病原性を失うこと (*Infect. Immun.* 69, 6893-6901 2001) から、病原性の一つと考えられている。そこで、病原性を持つビブリオブルニフィカスを検出する手段として *wza* 遺伝子を標的としたプライマーが Wright らによって開発された (U.S. Patent 6183973, Feb., 6, 2001)。しかし、ビブリオブルニフィカスの病原因子は CPS に限られないため、病原性を持つビブリオブルニフィカスを全て検出できるとは限らない。また、同じくビブリオブルニフィカスの病原性因子の一つとされているヘモリシン遺伝子 (*vvh* : *Vibrio vulnificus* hemolysin) を標的としたプライマーが開発されている (*Appl. Environ. Microbiol.* 57, 707-711 1991)。このプライマーは *vvh* 遺伝子がビブリオブルニフィカスに特異的な遺伝子であるものとして設計されているが、一方で *V. cholerae* や *V. mimicus* が有するヘモリシン遺伝子も *vvh* 遺伝子と相同性を示すことが報告されており (*Infect. Immun.* 58, 2706-2709 1990, *Infect. Immun.* 65, 1830-1835 1997)、さらにプライマーの設計にあたり、これらのヘモリシン遺伝子との比較が行われていないことから、特異性の検証が

十分とは言えない。

以上のように、既存の遺伝子を用いたピブリオブルニフィカス検出方法は、特異性が十分とは言えないものであった。

発明の開示

従来の遺伝子検査方法に共通している点は、細菌の「種」が遺伝的な多様性を内包する集団である事を無視していることである。ある細菌集団のメンバーと推測される 1 菌株の塩基配列を、その集団共通の、あるいは代表する配列として用いる事は、中立的変異を速やかに蓄積する遺伝子の分子進化の性質上大変危険である。即ち、本来検出されるべき菌株がプライマー領域の僅かな変異の為に増幅が阻害されて検出されなかったり、プライマーの特異性が十分でないために検出されるべきでない近縁株が検出されるといった誤判定の原因になる事が危惧される。そこで、特異性のバックグラウンドが証明されており、誤判定の可能性が低く、かつ実用上十分な増幅効率と増幅特異性を有する、高性能なピブリオブルニフィカスの検出・同定・定量用特異遺伝子増幅プライマー及びプローブの作成が必要とされていた。

細菌のある系統群の遺伝子の特異的に検出する方法を作成する為には、検出しようとする生物群、ならびにその系統的に近縁な生物群の塩基配列をなるべく多数収集する必要がある。また、特異検出のターゲットとする遺伝子は、最も近縁の生物とも判別可能なように、十分に異なる塩基配列を有している必要がある。

この為には、十分に早い進化速度を有していなくてはならない。また、高頻度に水平伝播する遺伝子（たとえば腸炎ピブリオの毒素遺伝子）の様に、系統とは無関係に存在する遺伝子を用いる事が出来ない。本発明でターゲットとして用いた *gyrB* 遺伝子、*rpoD* 遺伝子及び *recA* 遺伝子がコードするタンパク質は、生存に必須なタンパク質である。この為、水平伝播し難く、また適度な進化速度を有しているため、細菌の系統解析に適している。発明者らは、既に *gyrB* 遺伝子及び *rpoD* 遺伝子の PCR ダイレクトシーケンス法による簡便な塩基配列の決定方法を開発している（特開平 07-213229、特開平 08-256798）。

さらに、発明者らは、既に多数のピブリオブルニフィカスを環境より単離しており、他方に、公知のピブリオブルニフィカス保存株及び、16S rRNA 配列に基づく解析により本菌に近縁であることが報告されている *V.navarrensis*, *V.diazotrophicus*, *V.ordalii*,

Listonella *anguillarum*, *V.metschnikovii*, *V.cincinnatiensis*, *V.mimicus*, *V.chorelae*(*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 1449-1456(2001)) について、下記表 1 に示される菌株の *gyrB*、*rpoD* および *recA* 遺伝子の部分塩基配列を解析し、その配列に基づいた分子系統解析を行い、その系統関係を明らかにした。

表1. 使用した菌株

<i>V. vulnificus</i>	32株	ATCC 27562 T	
		ATCC 29306	
		ATCC 29307	
		ATCC 33147	
		ATCC 33148	
		ATCC 33149	
		ATCC 33814	
		ATCC 33815	
		ATCC 33816	
		ATCC 33817	
		ATCC 43382	
		ATCC BAA-86	
		ATCC BAA-87	
		ATCC BAA-88	
		ATCC BAA-89	
		ATCC BAA-90	
		JCM 3726	
		JCM 3727	
		JCM 3728	
		JCM 3729	
		JCM 3730	
		JCM 3731	
		環境分離株	10株
その他のビブリオ属保存株	48株		
<i>V. cholerae</i>	29株	臨床分離株	29株
<i>V. mimicus</i>	4株	ATCC 33653 T	
		ATCC 33654	
		ATCC 33655	
		ATCC 700326	
<i>V. diazotrophicus</i>		ATCC 33466 T	
<i>V. navarrensis</i>		ATCC 51183 T	
<i>V. metschnikovii</i>		ATCC 700040 T	
<i>V. cincinnatiensis</i>		ATCC 35912 T	
<i>V. ordalii</i>		NCIMB 2167	
<i>Listonella anguillarum</i>		NCIMB 6	
<i>V. hollisae</i>		ATCC 33564 T	
<i>V. alginolyticus</i>		IFO 15630 T	
<i>V. campbellii</i>		IFO 15631 T	
<i>V. carchariae</i>		IFO 15632 T	
<i>V. harveyi</i>		IFO 15634 T	
<i>V. nereis</i>		IFO 15637 T	
<i>V. parahaemolyticus</i>		IFO 12711 T	
<i>V. proteolyticus</i>		IFO 13287 T	
<i>V. tubiashii</i>		IFO 15644 T	
		食品由来分離株	5株

合計85株

即ち、上記表 1 に示される供試菌株を 2% NaCl 添加ブレインハートインフュージョン培地で増菌培養した後に、PUREGENE DNA Isolation Kit (Gentra SYSTEMS) を用いて染色体 DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型として、*gyrB* 増幅ユニバーサルプライマー UP-1E (5'-caggaaacagctatgaccaygsngngngaarttyra-3') および AprU(5'-tgtaaaacgacggccagtgcngrtcytytctygrca-3') を用いて約 900bp (大腸菌 K-12 株上の塩基配列上のポジション 331 - 1212 ; アミノ酸配列ではポジション 111 から 404 に相当する領域) の *gyrB* 遺伝子断片を PCR 増幅した。また同様に *rpoD* 増幅ユニバーサルプライマー 70F-M13(5'-caggaaacagctatgaccyatgmngaratgggnacngt-3') および 70R-M13(5'-tgtaaaacgacggccagtgngcytcnaccatytctytytt-3') を用いて約 800bp (大腸菌 K-12 株上の塩基配列上のポジション 334 - 1125 ; アミノ酸配列ではポジション 112 から 376 に相当する領域) の *rpoD* 遺伝子断片を PCR 増幅した。さらに、*recA* 遺伝子増幅ユニバーサルプライマー *recUF* および *recUR* (*recUF* : caggaaacagctatgaccatggaygtngaracnat, *recUR*:tgtaaaacgacggccagttanswrtaccangcncc) を用いて 648bp (大腸菌 K-12 株上の塩基配列ポジション 172-819 ; アミノ酸配列ではポジション 58-273 に相当する領域) の *recA* 遺伝子断片を PCR 法により増幅した。増幅反応は、耐熱性 DNA ポリメラーゼ (AmpliTaq Gold : Applied Biosystems 製) を用い、GENE MATE サーマルサイクラー (ISC BioExpress) を使用して行った。反応液は DNA 1 μ g, 50mMKCl, 10mM Tris-HCl pH8.3, 1.5mM MgCl₂, 0.01%ゼラチン、各 0.2mM の dNTP, 2.5U の AmpliTaq Gold, プライマー各 1 μ M を含む溶液を 50 μ l に調製した。反応条件は、AmpliTaq Gold の活性化(95 $^{\circ}$ C・10 分間)に続いて、94 $^{\circ}$ C・1 分間、アニール (*gyrB*, *rpoD* は 56 $^{\circ}$ C, *recA* は 54 $^{\circ}$ C) 1 分間、72 $^{\circ}$ C・2 分間の反応を 40 サイクル行った後に、72 $^{\circ}$ C・10 分間の伸長反応を行った。得られた PCR 産物は、1%アガロースゲル (SeaPlaque GTG agarose:BioWhittaker Molecular Applications 製) で電気泳動 (0.5xTAE, 100V・30 分間) 後、臭化エチジウムで 10 分間染色した。紫外線照射下で増幅産物の存在を確認し、ゲルより切り出した後、Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega 製) を用いて精製し、シーケンス反応の鋳型とした。シーケンス反応は、ユニバーサルプライマーに予め付加してある M13R (5'-CAGgAAACAgCTATgACC-3')、M13-21 配列(5'-TgTAAACgACggCCAgt-3') をプライマーとして、ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequenceing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems 製) を用い、GENE MATE サーマルサイクラー (ISC BioExpress)

を使用して行った。反応液は、DNA20ng、プライマー3.2pmol、BigDye Terminator Ready Reaction Mix8 μ l を混合し、最終体積 20 μ l に調製した。サイクルシーケンス反応は、92℃・10 分間の加熱後、96℃・10 秒、50℃・5 秒、60℃・4 分の反応を 25 サイクル行った。塩基配列の解析には ABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER (Applied Biosystems 製) を用いた。得られた塩基配列を用いて分子系統解析を行うにあたり、ビブリオブルニフィカスの近縁種をより正確に把握するために、*gyrB*、*rpoD* および *recA* 遺伝子部分配列を結合させた後に解析を実施した。即ち、上記 3 遺伝子配列を結合した上で Clustal W コンピュータプログラムを用いて多重アラインメント解析を行った後、PHYLP コンピュータプログラムパッケージを用い、木村の 2 パラメーターモデル (*J.Mol.Evol.* (1980)Vol.16,No.2,p.111-20) で算出した遺伝的距離に基づいて近隣結合法 (*Mol.Biol.Evol.*Vol.4,No.4,406-425) により分子系統樹を作製した。

この結果、ビブリオブルニフィカスは解析に供した全ての株が、ビブリオ属菌株中で独立した単系統をなすことが明らかとなった (図 1)。即ち、この系統に属する細菌群がビブリオブルニフィカスと判定されるべきことが示唆された。

そこで、ビブリオブルニフィカス菌群のみを検出可能な遺伝子検査法を確立するために、まず、近縁種間の塩基配列の差異を明らかとした。即ち、ビブリオブルニフィカス群内では保存され、他のビブリオ属細菌とは異なっている塩基の位置を同定した。具体的には、ビブリオブルニフィカスが属する系統群のコンセンサス配列を求めると共に、分子系統解析の結果から本系統に近縁であることが判明した図 1 中 C1~C3 の系統のコンセンサス配列を比較し、系統特異的情報図を作成した (図 2、3、4)。図 2~4 より、*gyrB* 遺伝子においては、配列表中の配列番号 1 の位置番号 3、15、69、95、121、123、132、136、138、139、231、424、549、557、603、700、701、726、727、728、734、735、738 及び 804 の位置、*rpoD* 遺伝子においては配列中の配列番号 2 の位置番号 21、33、60、120、126、235、260、312、315、340、354、396、414、459、462、570、686、689、732、750 及び 756 の位置、さらに *recA* 遺伝子においては配列表中の配列番号 3 の位置番号 9、81、138、153、172、180、208、228、237、288 及び 540 の位置がビブリオブルニフィカスが属する系統に特異的であることが明らかとなった。これら特徴的塩基を含む本系統に特異的な配列を用いることにより、高特異性を有するプローブ及び高特異性を有しかつ増幅効率に優れた遺伝子増幅プライマーを設計することが可能となる。例えば、近縁種と塩基

が相違する位置を必ず含むように、当該近縁種と相違する塩基を含む連続する 15 塩基以上の *gyrB*、*rpoD* および *recA* 遺伝子の塩基配列、好適には 20 塩基以上、更に好適には 20 塩基以上 40 塩基以下の連続する *gyrB*、*rpoD* および *recA* 遺伝子の塩基配列を用いて遺伝子増幅プライマーを設計することが可能となる。同様に、近縁種と塩基が相違する位置を必ず含むように、当該近縁種と相違する塩基を含む連続する 15 塩基以上の *gyrB*、*rpoD* および *recA* 遺伝子の塩基配列、好適には 20 塩基以上、更に好適には 20 塩基以上で 100 塩基以下の連続する *gyrB*、*rpoD* および *recA* 遺伝子の塩基配列を用いて、プローブを設計することが可能となる。さらに、当該プライマーおよびプローブの作成には、上記相違塩基を高頻度で含む領域、例えば、*gyrB* 遺伝子においては、121、123、132、136、138、又は 139 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、549 及び 557 を含む領域、700 及び 701 を含む領域、726、727、728、734、735、又は 738 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、*rpoD* 遺伝子においては、21 及び 33 を含む領域、120 及び 126 を含む領域、312 及び 315 を含む領域、340 及び 354 を含む領域、396 及び 414 を含む領域、459 及び 462 を含む領域、686 及び 689 を含む領域、732、750、又は 756 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、さらに *recA* 遺伝子においては 138 及び 153 を含む領域、172 及び 180 を含む領域、208、228 又は 237 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、228 及び 237 を含む領域が好適に使用できる。

これらの領域からなる鎖又はその相補鎖を遺伝子増幅プライマーとできるほか、必要に応じ、アダプター配列又はタグ配列等の他の配列を含めることができる。

好適なプライマーとしては、*gyrB* については、5'-gtgtctctggcggtctt-3' (請求項 10、配列番号 4)、5'-gatgcaccgcttgctatcatc-3 (請求項 11、配列番号 5)、5'-tgcggacttyacttcrc-3 (請求項 12、配列番号 6)、5'-gtccatgtagctgttcart-3 (請求項 13、配列番号 7)、若しくは 5'-ttgtctgccatgaaggattcc-3 (請求項 14、配列番号 8) の配列からなる鎖 (核酸) 若しくはその相補鎖又はこれらの配列のいずれか一配列を含む鎖 (核酸) 若しくはその相補鎖 (核酸) を挙げることができる。

rpoD については、好適なプライマーとしては、5'-aatcgacatcgctaamcga-3 (請求項 28、配列番号 9)、5'-gttcgacaaagtacaagcg-3' (請求項 29、配列番号 10)、5'-tcaagcagygttcagag-3' (請求項 30、配列番号 11)、5'-aatggcgctagagaag-3' (請求項 31、配列番号 12)、5'-cktraatgaacatggtcga-3 (請求項 32、配列番号 13)、

5'-gaactgatgctcgatgtgtt-3' (請求項 3 3, 配列番号 1 4)、若しくは 5'-aatgtcttctcgtmagyt-3' (請求項 3 4, 配列番号 1 5)、5'-ttgatgttgytyactgaaagc-3' (請求項 3 5, 配列番号 1 6) の配列からなる鎖 (核酸) 若しくはその相補鎖、又はこれらの配列のいずれか一配列を含む鎖 (核酸) 若しくはその相補鎖 (核酸) を挙げることができる。

RecA については、好適なプライマーとしては、5'-cctgtgtatgcgaagaarctt-3' (請求項 4 4, 配列番号 1 7)、5'-tatcgaccarttrtttgga-3' (請求項 4 5, 配列番号 1 8)、5'-aagmgcatcacagatttcaa-3' (請求項 4 6, 配列番号 1 9)、若しくは 5'-tcaaccgcmctgagcgagca-3' (請求項 4 7, 配列番号 2 0) の配列からなる鎖 (核酸) 若しくはその相補鎖、又はこれらの配列のいずれか一配列を含む鎖 (核酸) 若しくはその相補鎖 (核酸) を挙げることができる。

また、プライマーの場合、3 末端がビブリオブルニフィカスに特異的な塩基であることが望ましい。本件発明は、これらプライマーおよびプローブを他の試薬と組み合わせたビブリオブルニフィカスの検出、定量又は同定用のキットを包含するものである。

本発明のプライマーの遺伝子増幅方法は、PCR 法に限定されない。プライマーの特異性に基づく特異増幅方法、あるいは増幅の特異的阻害方法に用いる事が可能である。また、同様に特異増幅プライマーと標識特異プローブの組み合わせによる定量増幅反応にも用いる事が出来る。また、本件発明のプローブは単独で用いる事も可能である。その使用方法は、固相あるいは液相に限定されない。

サイバーグリーンなどの増幅した二本鎖 DNA を検出する試薬を用いて行なうリアルタイム PCR や FRET 等を応用したリアルタイム PCR を行なう際のプライマー及びプローブとしても利用可能である。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2001-306868 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、*gyrB*、*rpoD* および *recA* 遺伝子の部分配列を繋ぎ合わせた後に分子系統解析を行った結果を示した図。この図が近隣結合法による分子系統樹であり、ビブリオブルニフィカスが他のビブリオ属細菌とは異なった単一の系統に属していることを示しており図中に V.v. という標記で記した。また、ビブリオブルニフィカス以外の系統を C1~C4 に分類

した。*E. coli* K12 及び *V. cholerae* N 16961 株の遺伝子データはそれぞれ Gen Bank データベースのアクセションナンバー NC00913, NC002505 を用いた。なお、図面はページ順に上部から下部に配置されている。

図 2 は、図 1 で示したビブリオブルニフィカスが属するクラスターの *gyrB* 遺伝子のコンセンサス配列（上段）と近縁のクラスター（図 1 中の C1,2,3）の *gyrB* 遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオブルニフィカスに特異的な塩基であることを示す。D=A 又は G 又は T、H=A 又は C 又は T、V=A 又は C 又は G、R=A 又は G、Y=C 又は T、K=G 又は T、M=A 又は C、S=G 又は C、W=A 又は T、N=A 又は G 又は T 又は C を示す。

図 3 は、図 1 で示したビブリオブルニフィカスが属するクラスターの *rpoD* 遺伝子のコンセンサス配列（上段）と近縁のクラスター（図 1 中の C1,2,3）の *rpoD* 遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオブルニフィカスに特異的な塩基であることを示す。D=A 又は G 又は T、H=A 又は C 又は T、V=A 又は C 又は G、R=A 又は G、Y=C 又は T、K=G 又は T、M=A 又は C、S=G 又は C、W=A 又は T、N=A 又は G 又は T 又は C を示す。

図 4 は、図 1 で示したビブリオブルニフィカスが属するクラスターの *recA* 遺伝子のコンセンサス配列（上段）と近縁のクラスター（図 1 中の C1,2,3）の *recA* 遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオブルニフィカスに特異的な塩基であることを示す。D=A 又は G 又は T、H=A 又は C 又は T、V=A 又は C 又は G、R=A 又は G、Y=C 又は T、K=G 又は T、M=A 又は C、S=G 又は C、W=A 又は T、N=A 又は G 又は T 又は C を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。実施例はその一態様であり、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[実施例 1]

本発明により得られた、ビブリオブルニフィカスに特異的である領域を用いて設計した表 2 に示される遺伝子増幅用プライマーを用いた実施例を示す。

表2. ビブリオブルニフィカス特異検出用プライマー

標的遺伝子	プライマー	配列	長さ	位置 ^{a)}	方向
<i>gyrB</i>	VF1	5'-gatgcaccgcttgctatcatc-3'	21	121 - 141	センス
	VR1	5'-ttgtctgcatgaaggattcc-3'	21	740 - 720	アンチセンス
<i>rpoD</i>	VrF2	5'-gaactgatgctcgatgtgttt-3'	21	442 - 462	センス
	VrR2	5'-ttgatgttgytyactgaaagc-3'	21	770 - 750	アンチセンス
<i>recA</i>	VVrecF2	5'-cctgtgtatgcgaagaarctt-3'	21	133 - 153	センス
	VVrecR2	5'-tcaaccgcmctgagcgagca-3'	21	248 - 228	アンチセンス

a) : 配列番号1～3で表される塩基配列中での5'末端からの位置を示している。

尚、請求項 11、14、33、35、44 および 47 に記載のプライマーはそれぞれ表 2 中の VF1、VR1、VrF2、VrR2、VVrecF2 および VVrecR2 にあたり、それぞれ配列番号 5、配列番号 8、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 17 及び配列番号 20 あたる。

供試菌株から抽出した染色体 DNA を鋳型とした PCR を行った。増幅反応は、耐熱性 DNA ポリメラーゼ (AmpliTaq Gold : Applied Biosystems 製) を用い、GENE MATE サーマルサイクラー (ISC BioExpress) を使用して行った。反応液は DNA 0.1 μ g、50mM KCl、10mM Tris-HCl pH8.3、1.5mM MgCl₂、0.01% ゼラチン、各 0.2mM の dNTP、2.5U の AmpliTaq Gold、プライマー (濃度は表 3 参照) を含む溶液を最終体積 20 μ l に調製した。反応条件は、AmpliTaq Gold の活性化 (95℃・10 分間) に続いて、94℃ 1 分、アニール (*gyrB* 遺伝子の場合 65℃、*rpoD* 遺伝子の場合 63℃、*recA* 遺伝子の場合 65℃) 1 分、72℃ 1 分を 35 サイクル行い、最後に 72℃ 10 分の伸長反応を行った。

プライマーの組み合わせと増幅反応条件を表 3 に示した。

表3. ビブリオブルニフィカス特異検出用プライマーPCR条件

標的遺伝子	センスプライマー	センスプライマー	増幅産物 (bp)	PCR条件		
				アニール温度 (°C)	サイクル数	プライマー濃度 (μ M)
<i>gyrB</i>	VF1	VR1	620	65	35	0.1
<i>rpoD</i>	VrF2	VrR2	329	55	35	0.1
<i>recA</i>	VVrecF2	VVrecR2	116	60	35	0.1

増幅後の反応液 5 μ l を、1%アガロースゲル（アガロース S : (株) ニッポンジーン製）で電気泳動後（0.5xTAE、100V・30 分間）、臭化エチジウムで染色し、紫外線照射下で遺伝子の増幅の有無を確認した。*gyrB* 遺伝子を標的としたプライマー VF1 と VR1、*rpoD* 遺伝子を標的とした VrF2 と VrR2、及び *recA* 遺伝子を標的とした VVrecF2 と VVrecR2 の組み合わせを用いて、表 1 に示した菌株由来の DNA を PCR 法によりスクリーニングした結果を表 4 に示す。図 1 においてビブリオブルニフィカスに属するとされた菌株由来の DNA のみから増幅産物が確認され、共にビブリオブルニフィカスのみを検出可能であることが判明した。

表4. *V. vulnificus* 特異検出プライマーによるPCRの実施結果

連番	クラスタ	名 称	株 名 称	P C R		
				VF1& VR1	VrF2& VrR2	VVrecF2& VVrecR2
1	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 27562 T	+	+	+
2	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 29306	+	+	+
3	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 29307	+	+	+
4	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33147	+	+	+
5	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33148	+	+	+
6	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33149	+	+	+
7	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33814	+	+	+
8	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33815	+	+	+
9	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33816	+	+	+
10	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33817	+	+	+
11	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 43382	+	+	+
12	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-86	+	+	+
13	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-87	+	+	+
14	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-88	+	+	+
15	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-89	+	+	+
16	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-90	+	+	+
17	V.v	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3726	+	+	+
18	V.v	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3727	+	+	+
19	V.v	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3728	+	+	+
20	V.v	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3729	+	+	+
21	V.v	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3730	+	+	+
22	V.v	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3731	+	+	+
23	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.4	+	+	+
24	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.9	+	+	+
25	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.60	+	+	+
26	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.74	+	+	+
27	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.81	+	+	+
28	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.130	+	+	+
29	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.196	+	+	+
30	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.202	+	+	+
31	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.496	+	+	+
32	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.965	+	+	+
33	C3	<i>V. cholerae</i>	DU1	-	-	-
34	C3	<i>V. cholerae</i>	DU2	-	-	-
35	C3	<i>V. cholerae</i>	DU3	-	-	-
36	C3	<i>V. cholerae</i>	DU6	-	-	-
37	C3	<i>V. cholerae</i>	DU19	-	-	-
38	C3	<i>V. cholerae</i>	DU63	-	-	-
39	C3	<i>V. cholerae</i>	DU81	-	-	-
40	C3	<i>V. cholerae</i>	DU94	-	-	-
41	C3	<i>V. cholerae</i>	T2	-	-	-
42	C3	<i>V. cholerae</i>	T6	-	-	-
43	C3	<i>V. cholerae</i>	T97	-	-	-
44	C3	<i>V. cholerae</i>	T98	-	-	-
45	C3	<i>V. cholerae</i>	T116	-	-	-
46	C3	<i>V. cholerae</i>	NM20	-	-	-
47	C3	<i>V. cholerae</i>	NM26	-	-	-
48	C3	<i>V. cholerae</i>	NM48	-	-	-
49	C3	<i>V. cholerae</i>	NM67	-	-	-
50	C3	<i>V. cholerae</i>	NM84	-	-	-

51	C3	<i>V. cholerae</i>	NM85	-	-	-
52	C3	<i>V. cholerae</i>	Q37	-	-	-
53	C3	<i>V. cholerae</i>	Q57	-	-	-
54	C3	<i>V. cholerae</i>	Q59	-	-	-
55	C3	<i>V. cholerae</i>	Q66	-	-	-
56	C3	<i>V. cholerae</i>	Q70	-	-	-
57	C3	<i>V. cholerae</i>	Q90	-	-	-
58	C3	<i>V. cholerae</i>	K47	-	-	-
59	C3	<i>V. cholerae</i>	OPC24	-	-	-
60	C3	<i>V. cholerae</i>	OPC39	-	-	-
61	C3	<i>V. cholerae</i>	OPC60	-	-	-
62	C3	<i>V. mimicus</i>	ATCC 33563 T	-	-	-
63	C3	<i>V. mimicus</i>	ATCC 33654	-	-	-
64	C3	<i>V. mimicus</i>	ATCC 33655	-	-	-
65	C3	<i>V. mimicus</i>	ATCC 7000326	-	-	-
66	C2	<i>V. diazotrophicus</i>	ATCC 33466 T	-	-	-
67	C1	<i>V. navarrensis</i>	ATCC 51183 T	-	-	-
68	C2	<i>V. metschnikovii</i>	ATCC 700040 T	-	-	-
69	C2	<i>V. cincinnatiensis</i>	ATCC 35912 T	-	-	-
70	C2	<i>V. ordalii</i>	NCIMB 2167	-	-	-
71	C2	<i>Shewanella anguillarum</i>	NCIMB 6	-	-	-
72	C4	<i>V. alginolyticus</i>	IFO 15630 T	-	-	-
73	C4	<i>V. campbellii</i>	IFO 15631 T	-	-	-
74	C4	<i>V. carchariae</i>	IFO 15632 T	-	-	-
75	C4	<i>V. harveyi</i>	IFO 15634 T	-	-	-
76	C4	<i>V. nereis</i>	IFO 15637 T	-	-	-
77	C4	<i>V. parahaemolyticus</i>	IFO 12711 T	-	-	-
78		<i>V. proteolyticus</i>	IFO 13287 T	-	-	-
79	C4	<i>V. tubiashii</i>	IFO 15644 T	-	-	-
80	C4	<i>Vibrio</i> sp.	V11	-	-	-
81	C4	<i>Vibrio</i> sp.	V41	-	-	-
82		<i>Shewanella</i> sp.	V52	-	-	-
83	C4	<i>Vibrio</i> sp.	V65	-	-	-
84	C4	<i>Vibrio</i> sp.	V70	-	-	-
85		<i>V. hollisae</i>	ATCC 33564 T	-	-	-

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本件発明の *gyrB*、*rpoD*、及び *recA* 遺伝子プライマー及びプローブは、ヒブリオブルニフィカスとの系統関係を把握した上で設計したものであるため、特異性を向上させる検討が行われており、検出精度という点で優れている。従って、食品、臨床検体などから菌を単離せず、近縁細菌種が夾雑している状況で直接検出する場合に有利になる。

配列表フリーテキスト

配列番号 4-20 は、プライマーである。

請求の範囲

1. 配列表中の配列番号 1 の DNA ジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子 (*gyrB*) 中でビブリオ プルニフィカス菌群に特有な次の位置番号 3、15、69、95、121、123、132、136、138、139、231、424、549、557、603、700、701、726、727、728、734、735、738、又は 804 のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号 1 で表される遺伝子の断片。
2. 配列表中の配列番号 1 の DNA ジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子 (*gyrB*) 中で、ビブリオ プルニフィカス菌群に特有な次の位置番号 3、15、69、95、121、123、132、136、138、139、231、424、549、557、603、700、701、726、727、728、734、735、738、又は 804 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。
3. 請求項 2 で指定されたビブリオ プルニフィカスに特有な位置を高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項 2 記載の遺伝子増幅プライマー。
4. 配列表中の配列番号 1 の位置番号 3 及び 15 の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項 3 記載の遺伝子増幅プライマー。
5. 配列表中の配列番号 1 の位置番号 121、123、132、136、138、又は 139 の位置のいずれか 2 以上の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項 3 記載の遺伝子増幅プライマー。
6. 配列表中の配列番号 1 の位置番号 549 及び 557 の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項 3 記載の遺伝子増幅プライマー。
7. 配列表中の配列番号 1 の位置番号 700 及び 701 の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項 3 記載の遺伝子増幅プライマー。
8. 配列表中の配列番号 1 の位置番号 726、727、728、734、735、又は 738 の位置のいずれか 2 以上の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項 3 記載の遺伝子増幅プライマー。
9. 3'末端の塩基が該ビブリオ プルニフィカスに特有な請求項 2 で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項 2 記載の遺伝子増幅プライマー。
10. 5'-gtgtctggcggtctt-3'又は対応する相補鎖を含む請求項 2 記載の遺伝子増幅プラ

イマー。

1 1. 5'-gatgcaccgcttgctatcatc-3'又は対応する相補鎖を含む請求項 2 記載の遺伝子増幅プライマー。

1 2. 5'-tgcggacttyacttcrcct-3'又は対応する相補鎖を含む請求項 2 記載の遺伝子増幅プライマー。

1 3. 5'-gtccatgtagctgttcart-3'又は対応する相補鎖を含む請求項 2 記載の遺伝子増幅プライマー。

1 4. 5'-ttgtctgcatgaaggattcc-3'又は対応する相補鎖を含む請求項 2 記載の遺伝子増幅プライマー。

1 5. 配列表中の配列番号 1 の DNA ジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子(*gyrB*)中で、ビブリオ ブルニフィカス菌群に特有な次の位置番号 3、15、69、95、121、123、132、136、138、139、231、424、549、557、603、700、701、726、727、728、734、735、738、又は 804 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含むビブリオ ブルニフィカス検出、定量又は同定用プローブ。

1 6. 配列表中の配列番号 2 の RNA ポリメラーゼ $\sigma 70$ 因子をコードする遺伝子(*rpoD*)中で、ビブリオ ブルニフィカス菌群に特有な次の位置番号 21、33、60、120、126、235、260、312、315、340、354、396、414、459、462、570、686、689、732、750、又は 756 のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号 2 で表される遺伝子の断片。

1 7. 配列表中の配列番号 2 の RNA ポリメラーゼ $\sigma 70$ 因子をコードする遺伝子(*rpoD*)中で、ビブリオ ブルニフィカス菌群に特有な次の位置番号 21、33、60、120、126、235、260、312、315、340、354、396、414、459、462、570、686、689、732、750、又は 756 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。

1 8. 請求項 17 で指定されたビブリオ ブルニフィカスに特有な位置を高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項 17 記載の遺伝子増幅プライマー。

1 9. 配列表中の配列番号 2 の位置番号 21 及び 33 の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項 18 記載の遺伝子増幅プライマー。

2 0. 配列表中の配列番号 2 の位置番号 120 及び 126 の位置の塩基を含む鎖又はその

相補鎖を含む請求項 18 記載の遺伝子増幅プライマー。

21. 配列表中の配列番号 2 の位置番号 312 及び 315 の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項 18 記載の遺伝子増幅プライマー。

22. 配列表中の配列番号 2 の位置番号 340 及び 354 の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項 18 記載の遺伝子増幅プライマー。

23. 配列表中の配列番号 2 の位置番号 396 及び 414 の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項 18 記載の遺伝子増幅プライマー。

24. 配列表中の配列番号 2 の位置番号 459 及び 462 の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項 18 記載の遺伝子増幅プライマー。

25. 配列表中の配列番号 2 の位置番号 686 及び 689 の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項 18 記載の遺伝子増幅プライマー。

26. 配列表中の配列番号 2 の位置番号 732、750、若しくは 756 の位置のいずれか 2 以上の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項 18 記載の遺伝子増幅プライマー。

27. 3'末端の塩基が該ビブリオ プルニフィカスに特有な請求項 17 で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項 17 記載の遺伝子増幅プライマー

28. 5'-aatcgacatcgctaamcga-3'又は対応する相補鎖を含む請求項 17 記載の遺伝子増幅プライマー。

29. 5'-gttcgacaaagtacaagcg-3'又は対応する相補鎖を含む請求項 17 記載の遺伝子増幅プライマー。

30. 5'-tcaagcagygattcagag-3'又は対応する相補鎖を含む請求項 17 記載の遺伝子増幅プライマー。

31. 5'-aatggcgctagagaag-3'又は対応する相補鎖を含む請求項 17 記載の遺伝子増幅プライマー。

32. 5'-cktraatgaacatggtcga-3'又は対応する相補鎖を含む請求項 17 記載の遺伝子増幅プライマー。

33. 5'-gaactgatgctcgatgtgttt-3'又は対応する相補鎖を含む請求項 17 記載の遺伝子増幅プライマー。

34. 5'-aatgtcttctcgtgmagyt-3'又は対応する相補鎖を含む請求項 17 記載の遺伝子増幅プライマー。

35. 5'-ttgatgttgytyactgaaagc-3'又は対応する相補鎖を含む請求項17記載の遺伝子増幅プライマー。

36. 配列表中の配列番号2のRNAポリメラーゼ σ 70因子をコードする遺伝子(*rpoD*)中で、ビブリオブルニフィカス菌群に特有な次の位置番号21、33、60、120、126、235、260、312、315、340、354、396、414、459、462、570、686、689、732、750、又は756のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上を含むビブリオブルニフィカス検出、定量又は同定用プローブ。

37. 配列表中の配列番号3のRecAをコードする遺伝子(*recA*)中で、ビブリオブルニフィカス菌群に特有な次の位置番号9、81、138、153、172、180、208、228、237、288、又は540のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号3で表される遺伝子の断片。

38. 配列表中の配列番号3のRecAをコードする遺伝子(*recA*)中で、ビブリオブルニフィカス菌群に特有な次の位置番号9、81、138、153、172、180、208、228、237、288、又は540のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。

39. 請求項38で指定されたビブリオブルニフィカスに特有な位置を高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項38記載の遺伝子増幅プライマー。

40. 配列表中の配列番号3の位置番号138及び153の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項39記載の遺伝子増幅プライマー。

41. 配列表中の配列番号3の位置番号172及び180の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項39記載の遺伝子増幅プライマー。

42. 配列表中の配列番号3の位置番号208、228、又は237の位置のいずれか2以上の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項39記載の遺伝子増幅プライマー。

43. 3'末端の塩基が該ビブリオブルニフィカスに特有な請求項39で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項39記載の遺伝子増幅プライマー

44. 5'-cctgtgtatgcgaagaarctt-3'又は対応する相補鎖を含む請求項38記載の遺伝子増幅プライマー。

45. 5'-tatcgaccarttrtttgga-3'又は対応する相補鎖を含む請求項38記載の遺伝子増幅プライマー。

46. 5'-aagmgcatcacagatttccaa-3'又は対応する相補鎖を含む請求項38記載の遺伝子増幅プライマー。

47. 5'-tcaaccgcmctgagcgagca-3'又は対応する相補鎖を含む請求項38記載の遺伝子増幅プライマー。

48. 配列表中の配列番号3のRecAをコードする遺伝子(*recA*)中で、ビブリオブルニフィカス菌群に特有な次の位置番号9、81、138、153、172、180、208、228、237、288、又は540のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上を含むビブリオブルニフィカス検出、定量又は同定用プローブ。

49. 請求項2～14、17～35、及び38～47のいずれか1項に記載のプライマーを用いるビブリオブルニフィカスを検出、定量又は同定する方法。

50. 請求項2～14、17～35、及び38～47のいずれか1項に記載のプライマーを用いるビブリオブルニフィカスを検出、定量又は同定するキット。

図 1

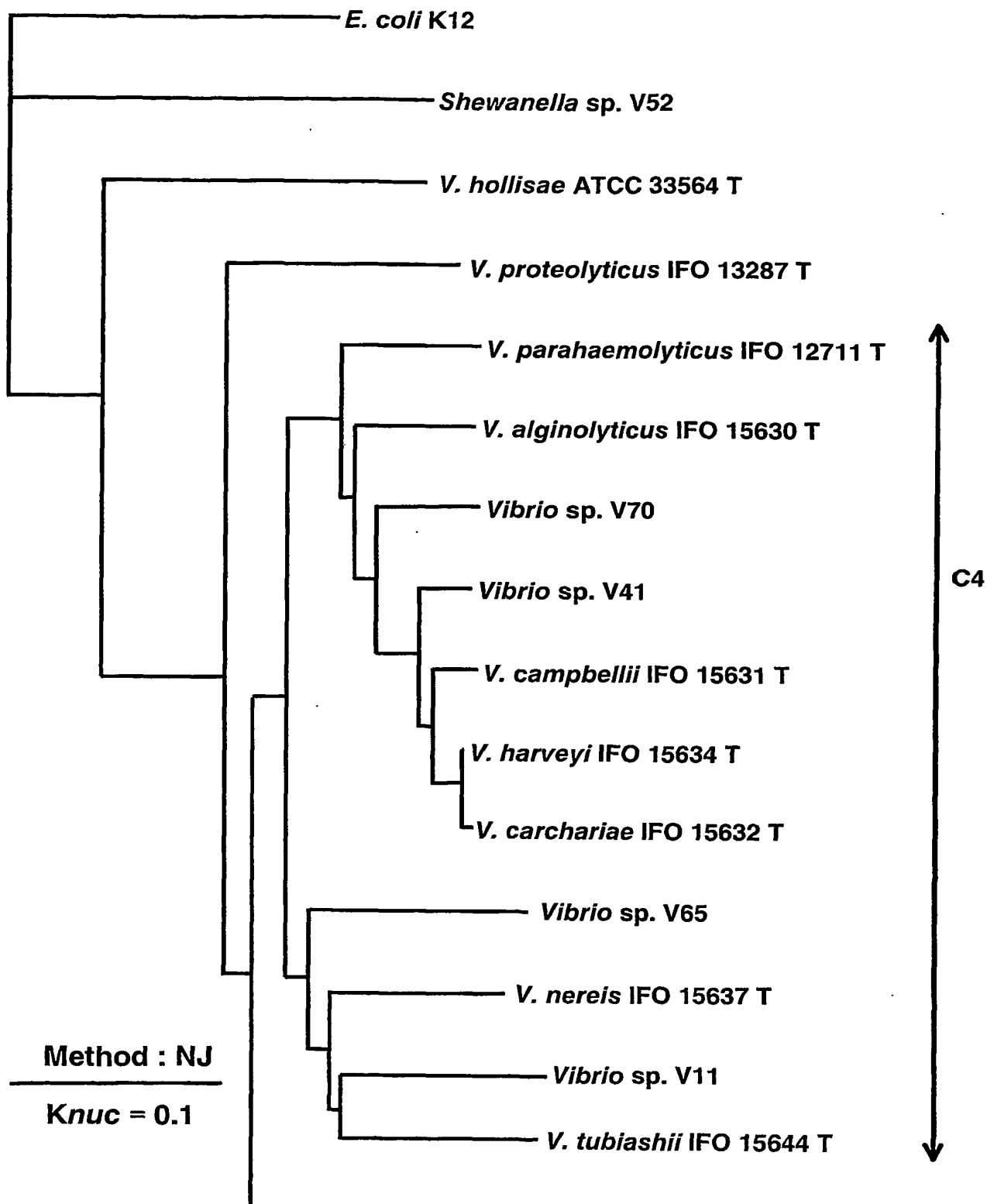
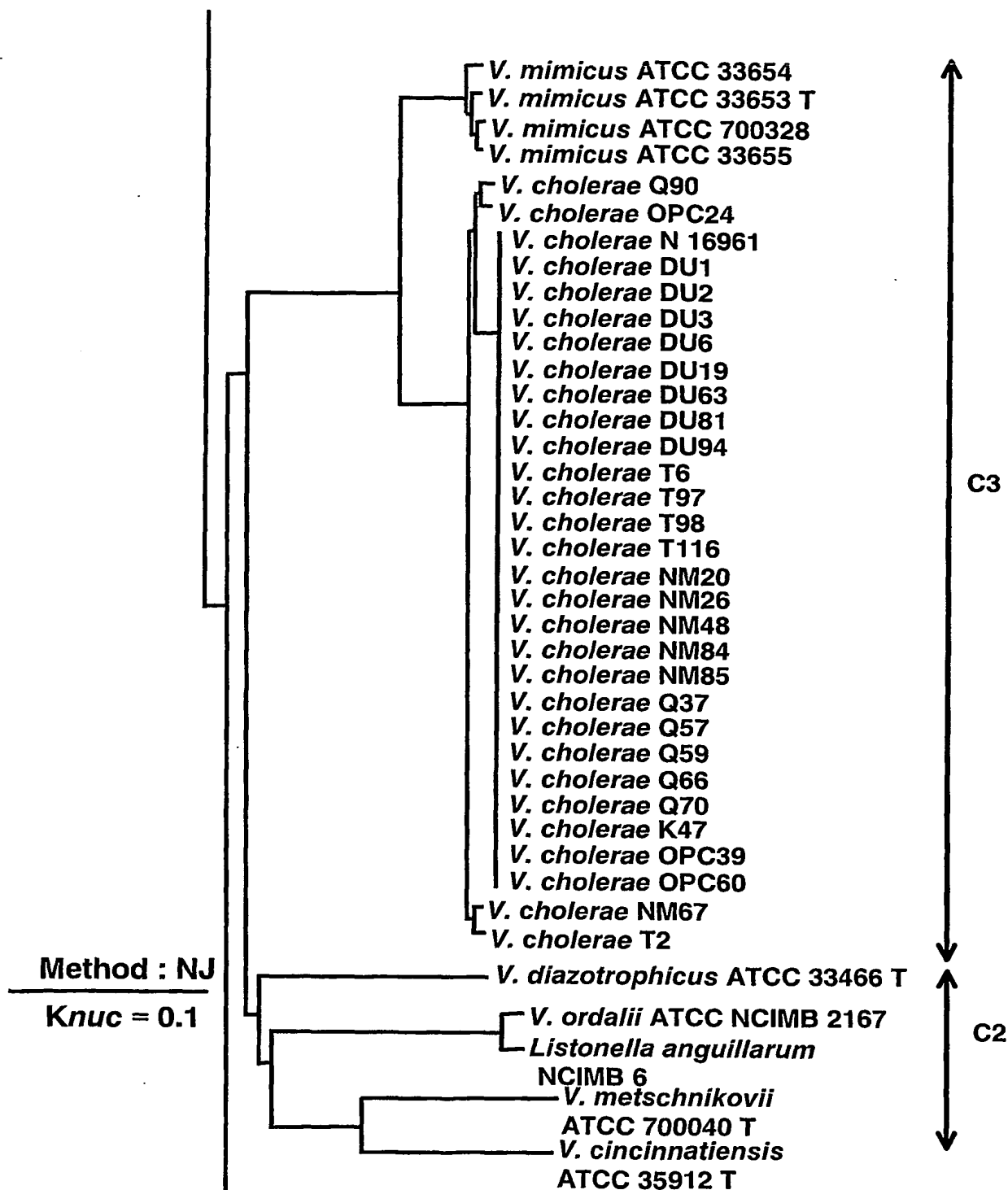
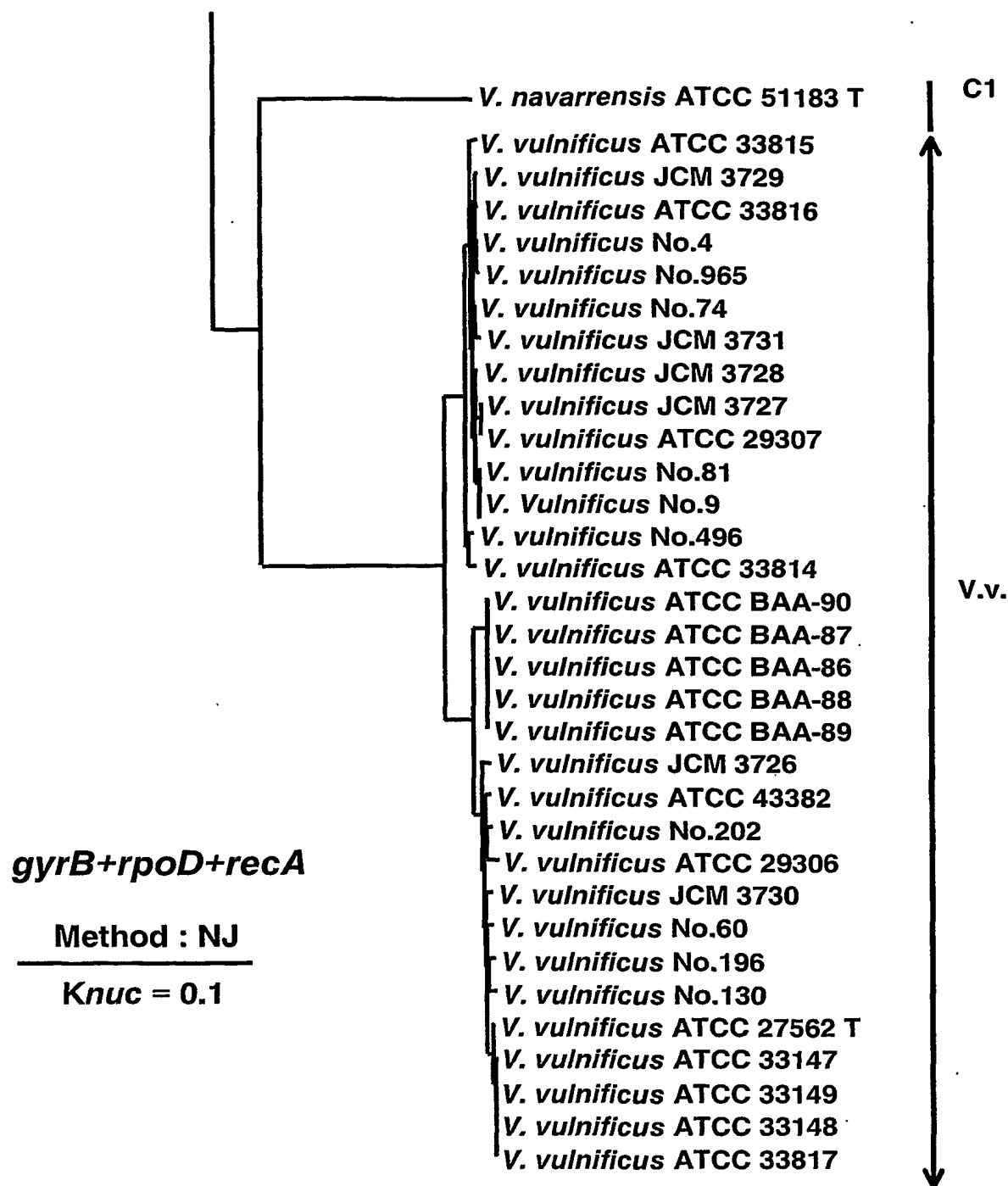


図 1



 1



```

1 GTGTCTGGCGTCTTACGGTGTWGGYGTTCGGTGGTTRAACGCAYTGTCTGAAAAAGTR 60
1 ..H..N..Y..YY.R..Y..B..N..K..K..N..N..B..Y..V..N.....D 60
** ** ** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * ** ** ** * ** ** *
61 CTRYTKACGATTTCATCGTGGTGGTCATACYCAYAGCCAAACCTATCGTCATGGTGTGCCT 120
61 YWD..N..Y..YY.Y..YRRY..HVMN.YB...WCN....B..YYRY..Y..B..D..D 120
** ** ** * ** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
61 GATGCACCGCTTGCTATCATCGYGATACYGAAAAACCGGTACCACGGTACGTTCTCTGG 180
61 C.A.YN..VY.RDSBG.DG.N..W..D..N..DMRH..H..D..H..VB.D..Y..Y... 180
* * ** * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
181 CCAAGTGCKSAAACCTTCASCAACATCGAATTTCATTATGACATCCTAGCGAAGCGTYTA 240
181 ..D..Y..H..V..B..Y.C...Y..Y....Y..Y..Y..H..Y..N..T..R..Y..R 240
** ** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
241 CGTGAGCTCTCTTYCTGAACCTCKGGCGTGCTKATCAAACCTGTTGATGAGCGGAAGAA 300
241 ..Y..R..B..W...Y.R..Y..W..B..N..V..YMRDY.RHN..Y..R..H....MR 300
** ** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
301 GATAAGRAAGATCACTTCATGTATGAAGTGGTATTCAAGCGTTYGYACTCACTGAAC 360
301 ..Y..RM.M..Y..Y..Y.KR..Y....K..K..YMR...R....KRSY..YY.N..Y 360
** ** * ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
361 CGCAACAARACMCCCATCCATGAAAAAGTATTCATTTAAKYCYGAGCGTGAAGACGGK 420
361 ..Y..Y..A..B..V..Y....V....V....V....R.HMW..V.....M..Y..B 420
** ** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
421 ATTGCKGTTGAAGTGGCGATGCAGTGGAAACGATGGYTTCCAAGAAAAACATCTACTTTT 480
421 .YYWSB..K....V..V....R....Y..Y.....R....R....Y....Y... 480
* ** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

```

gyrB-VV.con 481 ACCAACACATCCACAGCGTGAYGGTGGTACCCACTTAGCGGTTCCGYGCGCATTG 540
2,3,4gyrB.con 481 ..Y..Y..Y..Y..D..R..Y..T..B..DR.H..Y..R..B..D.....SN..VY.R 540
** * ** ** ** * ** ** ** *

gyrB-VV.con 541 ACGCGCACAYTGAACAGCTACATGGACAAAGAGGYTACTCRAAGAAAGCGAAACCGCG 600
2,3,4gyrB.con 541 ..B..H..B..N..Y.M..WY.....H..R.....S.WYWSS..R.....SM..R.VK.R 600
** ** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

gyrB-VV.con 601 ACTTCTGGYGAYGATGCGCGTGAAGGTTTGACYGCGWGTGTTTTCAGTHAAAGTRCCGGAT 660
2,3,4gyrB.con 601 ..V..K.....K.....Y..R..N..N..B..N..D..B.....D..D... 660
** ** ***** ** ** ** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** *

gyrB-VV.con 661 CCAAAATTCTCAAGCCAAACYAAAGACAAACTGGTTTCTAGYGAAGTRAAGTCCGCGAGTG 720
2,3,4gyrB.con 661 ..W..R.....N.....Y..RY.R..B..WTCB..R.....RD.N..R..K 720
** ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

gyrB-VV.con 721 GAATCCTTCATGGCAGACAAACTGAACGACTTCTTRGCGYARCACCCAAAGCGAAGCGAAA 780
2,3,4gyrB.con 721 ..R..DGCN...RRY..R..RY.BRMN..B..YY....N...M.Y..HWSY.....N... 780
** ** *** ** ** * ** ** * ** * ** * ** * ** *

gyrB-VV.con 781 ACCGTTTGTCTTAAGATTATCGACGCCGACGTCGCGTGAAGCAGRCRCGTAAAGCGCGT 840
2,3,4gyrB.con 781 MHV..B...WSN..R..Y..Y..T..V..D..H..N..Y.....V..V.....N..B 840
** *** ** ** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

gyrB-VV.con 841 GAAATGACRCGCCGTAAGGGGCRRTTAGAYCTTGCTGGCCTTCCW 885
2,3,4gyrB.con 841 ..R.....N..Y.....B...Y.V...Y.NR.W..YY.D..N 885
** ***** ** ***** ** * ** * ** * ** * ** *

rpod-VV.con	1	ACTCGTGAAGCGGAAATCGACATCGCTAAMCGAATTGAAGATGGTATCAACCAAGTACAG	60
2,3,4rpod.con	1	..W..Y.....Y..R..Y..T..Y..B..R..Y..Y.....W.....Y.....W..A	60
		** ** ***** ** ** ** **	
rpod-VV.con	61	TCSTCTGTTGCTGAATACCCAGGAACCATTCCTTATATCTKGAACAGTTCGACAAAGTA	120
2,3,4rpod.con	61	HSYK.NR.K..Y..R..Y..H..H..N..Y..W..Y..Y..W..R..R..Y..YMRD..K	120
		* * * * *	
rpod-VV.con	121	CAAGCGGAAGAACTTCGCCTMACTGATCTTATCAGTGGTTTGTGATCCAAATGCAGAT	180
2,3,4rpod.con	121	.WD..H..R..RY.W..YY.V..H..YM.N..YWSH..Y..YR.H..Y..DR.YKMHRRWB	180
		* * * * *	
rpod-VV.con	181	GAAACGGCGWGCTCCAACCGCAACACACATYGGTTCAGAGCTTGCAGAACTCTGATTGGAA	240
2,3,4rpod.con	181	.V.RSRRMN..N....N..D..N..Y..C..Y..W..RY..ND.HRRNK.N..YC.N.MD	240
		* * * * *	
rpod-VV.con	241	GATGAAGACAAYACCGACATCGACGATGAAGACGAAGAYNNNNNGAAGATGGCGAT---	297
2,3,4rpod.con	241	..Y..M..YRR.RMN.WYVMB..NSWY.....Y..D...GAVGAY.RM..YR.Y..HRRY	300
		** ** * * *	
rpod-VV.con	298	TCAAGCAGYGATTACAGAGGAMGATGTCGGCATCGACCCCTGAAATGGCGCTAGAGAAGTTY	357
2,3,4rpod.con	301	DVMRVYDVHRRYDVY..W..A..DRYN..H..Y..Y.....RS.B..DYKW..R..A...	360
		** ** * * *	
rpod-VV.con	358	ACTCARCTTCGTAACAGCTAYCAGAACTCTGCAACTTGCCKTRAATGAACATGGTCGAGAG	417
2,3,4rpod.con	361	.MYS..Y.D..YRRYMRV.W...RR.YB.D..RY.H..KRW..Y..RYWY..YNR.YR.N	420
		* * * * *	

rpod-VV.con	418 AGTGCTCAAACAGCTCAAGCCCATGAACCTGATGCTCGATGTGTTAAAGAGTTTCGTCTA	477
2,3,4rpod.con	421 ..YNHMMRRYHBMNS....NHMRRVB.DR.RY.VRMDR.H..CMRH..R..Y..HY.V	480
	**** * * * * *	
rpod-VV.con	478 ADCCGAAGCAGTTTGACCATTTGGTTAACGAACCTCGCACCGCYATGGATCGCGTTCGT	537
2,3,4rpod.con	481 ..R..D..R..R..Y..YY.YY.N..HRMHRMD..DM.Y.MHK.D....W..Y..D..Y	540
	** ** ** ** ** * * * * *	
rpod-VV.con	538 ACKCAAGARCGYTTGATCATGAARTCTGCGGTAGAAATCGCSAARATGCCRAAGAARTCK	597
2,3,4rpod.con	541 ..H.....Y..R.V...MRVD.N.YD..Y...DWM.SB.....D..R.....R	600
	** ***** ** * * * * *	
rpod-VV.con	598 TTYATYGCWCTCTTYACTGGCAACGARTCWARGAAGAATGGTTAGATMAGATCCTMGYY	657
2,3,4rpod.con	601K.NB.V.....H..Y..Y.....NR.Y..N.MD...Y.N..YV.RR.NM.Y.CD	660
	***** * * ***** ** * * * * *	
rpod-VV.con	658 TCTGAYAGCCRTACGYAGAAAAGATYAARCTKCACGAAGAAGACATTCGTTCGTCAATC	717
2,3,4rpod.con	661 W.H..H..R..W..Y..WSMV..RR.HMGHSMV.H.....VRHB..Y..Y..Y..W..Y	720
	* * * * * ** * * * * *	
rpod-VV.con	718 DCCAAGCTAAGAGCAATTGAAGAAGAAACGTCGCTTTCAGTRARCAACATCAAAGACATC	777
2,3,4rpod.con	721 SMN..RY.DMRDRYB..Y..RS.R..R..N..WY.NDMK..DV.NMRY..Y....Y..Y	780
	** * * * * ** * * * * *	
rpod-VV.con	778 AGCCGTCGTATGTCATMGGTGAAAGCMAAAGCTCGCCGTCG	819
2,3,4rpod.con	781Y..Y....;W..Y.....R..D.....W..Y..D...	822
	***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****	

```

recA-VV.con          1 CCAATGGCGCGTATCGTTGAAATTTTGGTCCAGAAATCTTCAGGTAACACCGTTGACC 60
2,3,4recA.con      1 ..R.....D..D..Y..N..RR.B.WY..Y..W.....D..V..W.....N..VY.R..N 60
** ***** ** ** * * * * * ** ***** ** * * * * *

recA-VV.con          61 CTTGAGCTGATCGCTGCRGCTCAACGTGAAGGCAAAACTTGTGCGTTTATCGATGCGYGAG 120
2,3,4recA.con      61 ..K..RY.R..Y..NK.W..R..R..H.WR..Y.....B.....B..Y..Y.....N..R 120
** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

recA-VV.con          121 CACGCGTTRGATCCCTGTGTATGCGGAAGAARCTTGGCGTWAATATCGACCARTTRTTGGTA 180
2,3,4recA.con      121 ..Y..NY.N..Y..NR.Y..Y..BMRV...Y.S..B..B..B..YR.YS.DC.VY.B..B 180
** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

recA-VV.con          181 TCTCAGCCYGAYACBGGTGAACAAGCRTTGGAAATCTGTGATGCKCTTGCTCGCTCAGGK 240
2,3,4recA.con      181 ..W..R..W.....Y..R.....C.D.....H.....Y..NY.R..N..Y..T... 240
** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

recA-VV.con          241 GCGGTTGAYGTTATTGTTGTGCGAYTCTGTGCKGCMGCAATTGACRCCAAAGCAGAAATYGAA 300
2,3,4recA.con      241 ..NR.N.....B..B..BR.Y.....N..N..D..NY.R.....R..A..N..R..... 300
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

recA-VV.con          301 GGTGAGATGGGYGAYTCGCACATGGGTCNCAAGCTCGTATGCTMTCTCAAGCGATGCGT 360
2,3,4recA.con      301 ..B..R.....WSS..Y.....B.....R..D.....Y.B..B.....R..... 360
** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

4

```
recA-VV.con      361 AAGYTAACGGGKAACCTAAARCAGTCTAACTGTAATGTTGATCTTTCATYAACCAGATYCGT      420
2,3,4recA.con    361 ..R..V..K..Y...Y.N.....R..N..Y..Y.....Y..Y.....R....K
** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **   ** ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **
** ** ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **

recA-VV.con      421 ATGAAGATYGGKGTGATGTTGGTAAYCCAGAAACCAACRGGTGGTAACGCWCTGAAA      480
2,3,4recA.con    421 .....R.....T.....Y..Y..C..W..R..H..M..N..Y....Y..N..D..R
**** ** ** **   **** ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **

recA-VV.con      481 TTCTACGCTTCTGTWCGTCTTGATATTCGCCGTACTGGTGCRAATCAAAGAAGGYGATGAG      540
2,3,4recA.con    481 ..Y..Y.....D.....YY.D....Y..Y.....D..BK.D..Y....R..H..H..A
** ** ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **

recA-VV.con      541 GTMGTTGGGTAAYGAAACGCGYATCAAAGTGGTGAAGAATAAGATCGCTGCCGCGTTTAAA      600
2,3,4recA.con    541 ..B..N..B.....N.....Y..R..N..K..R..Y..R..Y..N..N..V.....R
** ** ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **   ** ** **

recA-VV.con      601 GAAGCCAAAYACYCAAATTATGTAYGGCCARGGCWTTAACCGYGAAGGY      648
2,3,4recA.con    601 S.R..BR...B..R..YM.K....H..A..BT.Y..Y.....R..T
* ** ** ** **   * ** **   * ** **   * ** **   * ** **   * ** **   * ** **   * ** **
```

SEQUENCE LISTING

<110> Nichirei Corporation

<120> Method of the detection of *Vibrio vulnificus* and primers and probes therefor

<130> PH-1839-PCT

<150> JP 2002-255126

<151> 2002-08-30

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 885

<212> DNA

<213>

<400> 1

gtgtctggcg gtcttcacgg tgtwgggygtt tcggtggtra acgcaytgic tgaaaaagtr 60
ctrytkacga ttcatcgtgg tggtcatacy cayagccaaa cctatcgtca tgggtgtgcct 120
gatgcaccgc ttgctatcat cggygatacy gaaaaaacgg gtaccacggt acgtttcttg 180
ccaagtgcks aaaccttcas caacatcgaa tticattatg acatcctagc gaagcgtyta 240
cgtgagctct ctttyctgaa ctckggcgtg tckatcaaac tgtttgatga gcgcgaagaa 300
gataagraag atcacttcat gtatgaaggt ggtattcaag cgattygyac tcacttgaac 360
cgcaacaara cmcccatcca tgaaaaagta ttccatttiya aykcygagcg tgaagacggk 420

attgckgttg aagtggcgat gcagtggaac gatggyttcc aagaaaacat ctactgtttt 480
accaacaaca tcccacagcg tgayggtggt acccacttag cgggtttccg ygcggcattg 540
acgcgcacay tgaacagcta catggacaaa gaaggytact craagaaagc gaaaaccgcg 600
acttctggyg aygatgcgcg tgaaggtttg acygcwgttg tttcagthaa agtrccggat 660
ccaaaattct caagccaaac yaaagacaaa ctggtttcta gygaagtraa gtccgcagtg 720
gaatccttca tggcagacaa actgaacgac ttcttrgcyg arcaccaag cgaagcgaaa 780
accgtttgtt ctaagattat cgacgccgca cgtgcgcgtg aagcagcrgc taaagcgcgt 840
gaaatgacrc gccgtaaagg ggcrttagay cttgcitggcc ttccw 885

<210> 2

<211> 819

<212> DNA

<213>

<400> 2

actcgtgaag gcgaaatcga catcgctaam cgaattgaag atggtatcaa ccaagtacag 60
tcstctgttg ctgaataccc aggaaccatt ccttatattc tkgaacagtt cgacaaagta 120
caagcggaag aacttcgcct mactgatctt atcagtgggt ttgttgatcc aaatgcagat 180
gaaacggcwg ctccaaccgc aacacacaty ggttcagagc ttgcagaatc tgatttggaa 240
gatgaagaca ayaccgacat cgacgatgaa gacgaagayn nnnnngaaga tggcgattca 300
agcagygatt cagaggamga tgtcggcatc gaccctgaaa tggcgctaga gaagttyact 360
carcttcgta acagctayca gaatctgcaa cttgcckira atgaacatgg tcgagagagt 420
gctcaaacag ctcaagccca tgaactgatg ctcgatgtgt ttaaagagtt tcgtctaacd 480
ccgaagcagt ttgaccattt ggtaaacgaa cttcgaccgc cyatggatcg cgttcgtack 540
caagarcgyt tgatcatgaa rtctgcggta gaaatcgcsa aratgccraa gaartcktty 600
atygcwctct tyactggcaa cgaricwarc gaagaatggi tagatmagat cctmgyytct 660
gayaagccrt acgyagaaaa gatyaaarctk cacgaagaag acattcgtcg ttcaatcdcc 720
aagctaagag caattgaaga agaaacgtcg ctttcagtra rcaacatcaa agacatcagc 780

cgtcgtatgt ctatmggtga agcmaaagct cgccgtgcg

819

<210> 3

<211> 648

<212> DNA

<213>

<400> 3

ccaatgggcc gtatcgttga aatTTTTTggt ccagaatctt caggtaaaac cacgttgacc 60
cttgagctga tcgctgcr gc tcaacgtgaa ggcaaaactt gtgcgtttat cgatgcygag 120
cacgcgttrg atcctgtgta tgcgaagaar cttggcgtwa atatcgacca rtrrttggt 180
tctcagccyg ayacbggtga acaagcrttg gaaatctgtg atgckcttgc tcgctcaggk 240
gcggttgayg ttattgttgt cgaytctgtk gcmgcattga crccaaaggc agaaatygaa 300
ggtgagatgg gygaytcgca catgggtctn caagctcgta tgctmtctca agcgatgcgt 360
aagytaacgg gkaacctaaa rcagtctaac tgtatgtgta tcttcatyaa ccagatycgt 420
atgaagatyg gkgatgatgtt tggtaaycca gaaaccacaa crggtggtaa cgcwctgaaa 480
ttctacgctt ctgtwcgtct tgatattcgc cgtactgggtg cratcaaaga aggygatgag 540
gtmgtgggta aygaaacgcg yatcaaagtg gtgaagaata agatcgctgc gccgttttaa 600
gaagccaaya cycaaattat gtayggccar ggcwitaacc gygaaggy 648

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

gtgtctggcg gtctt

15

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

gatgcaccgc ttgctatcat c

21

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

tgcggactty acttcrct

18

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

gtccatgtag ctgttcart

19

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

ttgtctgcca tgaaggattc c

21

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

aatcgacatc gctaamcga

19

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

gttcgacaaa gtacaagcg

19

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

tcaagcagyg attcagag

18

<210> 12

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

aatggcgcta gagaag

16

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13

cktraatgaa catggtcga

19

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence.

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14

gaactgatgc tcgatgtgtt t

21

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 15

aatgtcttct tcgtgmagyt

20

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16

ttgatgttgy tyactgaaag c

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 17

cctgtgtatg cgaagaarct t

21

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 18

tatcgaccar ttrttggta

19

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 19

aagmgcatca cagatttcca a

21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20

tcaaccgcmc ctgagcgagc a

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10846

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/31

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/31

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
BIOSIS/WPI (DIALOG), CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	JP 2003-047474 A (Nichirei Corp.), 18 February, 2003 (18.02.03), Full text & WO 03/14393 A1	16-36
A	JP 09-252783 A (Nippon Suisan Kaisha, Ltd.), 30 September, 1997 (30.09.97), Full text & WO 97/35970 A1 & EP 965636 A1 & US 6048697 A	1-15
A	Venkateswaran K. et al., Cloning and nucleotide sequence of the gyrB gene of Vibrio parahaemoly- ticus and its application in detection of this pathogen in shrimp, Appl. Environ. Microbiol., 1998, Vol.64, No.2, pages 681-7	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	---

Date of the actual completion of the international search
26 November, 2003 (26.11.03)

Date of mailing of the international search report
09 December, 2003 (09.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10846

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 07-213299 A (Marine Biotechnology Institute Co., Ltd.), 15 August, 1995 (15.08.95), Full text (Family: none)	1-15
A	JP 2001-245677 A (SRL, Inc.), 11 September, 2001 (11.09.01), Full text (Family: none)	1-15
A	Yuji KOIZUMI et al., "rpoD Idenshi Hairetsu ni yoru Bunshi Keito Kaiseki ni Motozuita Choen Vibrio Tokui Kenshutsu PCR Primer no Sekkei", Japanese Society of Food Microbiology Gakujutsu Sokai Koen Yoshishu, 2001, 22nd, page 36	16-36
A	JP 08-256798 A (Marine Biotechnology Institute Co., Ltd.), 18 October, 1996 (18.10.96), Full text (Family: none)	16-36
A	Stine O.C. et al., Phylogeny of Vibrio cholerae based on recA sequence, Infect.Immun., 2000, Vol.68, No.12, pages 7180-5	37-50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10846

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10846

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

The inventions as claimed in claims 1 to 15 relate to a primer containing bases characteristic to *Vibrio vulnificus* strains in a gene encoding DNA gyrase β subunit.

The inventions as claimed in claims 16 to 36 relate to a primer containing bases characteristic to *Vibrio vulnificus* strains in a gene encoding RNA polymerase σ factor.

The inventions as claimed in claims 37 to 50 relate to a primer containing bases characteristic to *Vibrio vulnificus* strains in a gene encoding RecA.

Although the technical feature common to claims 1 to 15, 16 to 36 and 37 to 50 resides in *Vibrio vulnificus* strains, these strains had been publicly known. Therefore, the technical feature common to claims 1 to 15, 16 to 36 and 37 to 50 is not novel.

Accordingly, there is no matter common to all claims.

Since there is no other common matter seemingly being a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2, no technical relevancy can be found among these groups of inventions different from each other in the meaning within PCT Rule 13.

Such being the case, it is obvious that claims 1 to 15, 16 to 36 and 37 to 50 do not comply with the requirement of unity of invention.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO3/10846

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12Q1/68, C12N15/31

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12Q1/68, C12N15/31

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus(JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq BIOSIS/WPI(DIALOG) CA(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	JP 2003-047474 A (株式会社ニチレイ) 2003. 02. 18, 全文 & WO 03/14393 A1	16-36
A	JP 09-252783 A (日本水産株式会社) 1997. 09. 30, 全文 & WO 97/35970 A1 & EP 965636 A1 & US 6048697 A	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 11. 03

国際調査報告の発送日

09.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高畑 栄二

4N

3126

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Venkateswaran K. et al., Cloning and nucleotide sequence of the gyrB gene of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> and its application in detection of this pathogen in shrimp, Appl. Environ. Microbiol., 1998, Vol.64, No.2, pages 681-7	1-15
A	JP 07-213299 A (株式会社海洋バイオテクノロジー研究所) 1995.08.15, 全文 (ファミリーなし)	1-15
A	JP 2001-245677 A (株式会社エスアールエル) 2001.09.11, 全文 (ファミリーなし)	1-15
A	小泉雄史 他, rpoD遺伝子配列による分子系統解析に基づいた腸炎 ビブリオ特異検出PCRプライマーの設計, 日本食品微生物学会学術 総会講演要旨集, 2001, 22nd, pages 36	16-36
A	JP 08-256798 A (株式会社海洋バイオテクノロジー研究所) 1996.10.08, 全文 (ファミリーなし)	16-36
A	Stine O. C. et al., Phylogeny of <i>Vibrio cholerae</i> based on recA sequence, Infect. Immun., 2000, Vol.68, No.12, pages 7180-5	37-50

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(特別ページ参照)

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

(第1ページの続葉(1)第II欄より続く)

請求の範囲1-15に記載された発明は、DNAジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子中で、ビブリオ ブルニフィカス菌群に特有の塩基を含むプライマーに係る発明である。

請求の範囲16-36に記載された発明は、RNAポリメラーゼ σ 因子をコードする遺伝子中で、ビブリオ ブルニフィカス菌群に特有の塩基を含むプライマーに係る発明である。

請求の範囲37-50に記載された発明は、RecAをコードする遺伝子中で、ビブリオ ブルニフィカス菌群に特有の塩基を含むプライマーに係る発明である。

請求の範囲1-15、16-36、及び37-50に共通の技術的特徴は、ビブリオ ブルニフィカス菌群であるが、該菌群は公知であるから、請求の範囲1-15、16-36、及び37-50に共通の技術的特徴は、新規でない。

それ故、請求の範囲全てに共通の事項はない。

PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の意味他の共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

よって、請求の範囲1-15、16-36、及び37-50は、発明の単一性の要件を満たしていないことが明らかである。